

DOCKET NO.: 264832US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Syoichi ICHIHASHI

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/08799

INTERNATIONAL FILING DATE: July 10, 2003

FOR: METHOD OF CONSTRUCTING ORCHID HAPLOID BY TREATING UNFERTILIZED ORCHID FLOWER WITH AUXIN AND METHOD OF GROWING ORCHID

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	2002-213746	23 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/08799. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Rec'd ST/PTL 21 JAN 2005 #2

PCT/JP 03/08799

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

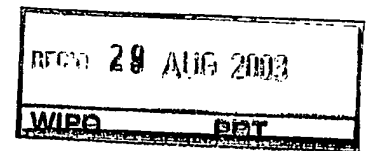
10.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月23日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-213746
[ST. 10/C]: [JP2002-213746]



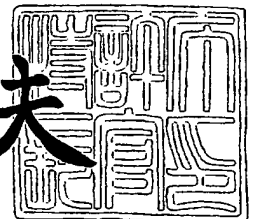
出 願 人
Applicant(s): サッポロホールディングス株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3065642

【書類名】 特許願

【整理番号】 SP510-1362

【提出日】 平成14年 7月23日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A01G 1/00
A01H 3/04

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢1 愛知教育大学内

【氏名】 市橋 正一

【特許出願人】

【識別番号】 000002196

【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社

【代理人】

【識別番号】 100070150

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊東 忠彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002989

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラン類未受粉花へのオーキシシン処理によるラン類の半数体作出方法及びラン類育成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ラン類未受粉花にオーキシシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて生育して半数体植物のラン類を得ることを特徴とするラン類の半数体作出方法。

【請求項 2】 ラン類の開花日から開花 3 0 日後までの間の期間にラン類未受粉花へのオーキシシン水溶液の滴下を行うことを特徴とする請求項 1 に記載のラン類の半数体作出方法。

【請求項 3】 オーキシシン溶液は未受粉花のずい柱又はずい柱を含む部位に滴下することを特徴とする請求項 1 に記載のラン類の半数体作出方法。

【請求項 4】 オーキシシン溶液の濃度を 0. 1 % ~ 5. 0 % である請求項 1 に記載のラン類の半数体作出方法。

【請求項 5】 オーキシシン水溶液は、インドール酢酸 (IAA)、4-クロロインドール酢酸、フェニル酢酸、2, 4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D)、 α -ナフタレン酢酸 (NAA)、2, 6 ジクロロ安息香酸、インドール酪酸 (IBA)、4-クロロフェノキシ酢酸、5-クロロインタゾール酢酸エチル及び 2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸からなる群より選択される水溶液である請求項 1 に記載のラン類の半数体作出方法。

【請求項 6】 ラン類未受粉花にオーキシシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて育成したラン類植物から半数体植物を判別し、半数体植物と判別された発芽した種子を育成してラン類の種子繁殖品種とするラン類の種子繁殖品種生産方法。

【請求項 7】 半数体植物の判別は、発芽後 1 ~ 5 ヶ月の期間において採取した試料の DNA 含量又は染色体数を測定することにより行うことを特徴とする請求項 6 に記載のラン類の種子繁殖品種とするラン類の種子繁殖品種生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術的分野】

本発明は、ラン類の未受粉花にオーキシンを処理することにより、半数体を作出する方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

観賞用の花としてラン類の人気は常に高く、近年ではその需要に応じて大量の栽培が行われている。この高い人気を支えている要因として、消費者の嗜好に合致し、大量の栽培に耐えうる経済性の高いラン類品種が開発され続けていることがあげられる。これらの品種は伝統的な交雑育種によって開発されたものであり、この交雑育種とは交配によって得られた実生集団から優良な個体を選抜するというものである。得られた優良個体は大量消費に順ずるレベルまで繁殖することが必要であり、大量繁殖法として組織培養によるクローン増殖が利用されている。

【0003】**【発明が解決しようとする問題】**

組織培養によるクローン増殖の技術はいまだ不安定であり、品種による難易、組織培養中の突然変異などの問題がある。これらの問題を回避する為に、品種毎の試験増殖を行う、増殖率を低く抑えるなどの策が採られているが、いずれの方法も突然変異の発生を完全に抑えられるものではなく、組織培養によるクローン増殖ラン類では奇形花の発生が確認されている。

【0004】

この突然変異は、組織培養中に行われる自然状態では考えられない細胞増殖などで引き起こされるものである。これに対し、過去に行われていた植物の自然な増殖による株分け法などでは、突然変異の発生は非常に少ない。しかしながら、株分け法では増殖率が非常に低く、近年の大量消費に対応することは困難である。

【0005】

一般的には種子を繁殖に利用することにより、突然変異などの問題が無く、高い増殖率が得られる繁殖が行われているが、ラン類植物は雑種性が高いため、種

子繁殖集団の均一性に著しい問題が見られる。この種子繁殖集団の均一性を高める一つの方法として、半数体植物を利用した方法がある。

【0006】

半数体植物はコルヒチン処理などによって遺伝子を倍化させることが可能である。この遺伝子を倍化された植物は純系植物であり、これらの純系植物を自家交配させることにより、均一な種子繁殖集団が得られる。また、純系植物間の交配で得られた雑種第一代 (F1 植物) には、個体間での遺伝的な差が無く、均一な後代を得ることが可能であることから、この雑種第一代からも均一な種子繁殖集団が得られる。

【0007】

これらの種子繁殖集団は均一であることもさることながら、組織培養によるクローン増殖を経てない為に突然変異の危険性が低く、雑種第一代から得られた種子繁殖集団では雑種強勢などの好ましい付加的特性も期待される。また、組織培養によるクローン増殖においては、同一培養組織から大量の増殖を行うと培養期間が長くなる為、突然変異の危険性も高くなるが、種子繁殖集団では短期間で大量の繁殖が可能となる。

【0008】

半数体作出法としては、特定植物にしか有効ではないが、薬培養法と種間交雑法が一応確立している。薬培養を利用した半数体作出はタバコ、イネ、コムギなどの育種に利用され、種間交雑法による半数体作出はジャガイモ、大麦などでの育種に利用されているが (小林 仁, 1987. 「新しい植物育種技術」, 養賢堂, 110-112.)、ラン類植物においては、その半数体の作出方法は知られていなかった。

【0009】

一方、オーキシンは植物成長調節物質 (植物ホルモン) の一種であり、その作用の一つに着果および果実の肥大成長があげられる。オーキシンを処理すると受精しなくても果実が肥大成長する単為結果を起こし、生育を続けることは知られている (倉石晋, 1988. 「植物ホルモン」 (第2版), 東京大学出版会, 45-46.)。この作用はトマト栽培に利用され、トマト未受精花にオーキシンを処理する

ことにより、受粉が行われなくても果実の着生、肥大が行われる。これはオーキシンの作用により、単為発生が誘発され、未受精の子房が発育したものである。しかし、高濃度のオーキシンはエチレン発生を誘導、果実の離脱を促してしまい、適度な処理濃度でないと、未受精子房は落下し、種子を得ることは出来ない。

【0010】

ランの一種であるシランにエビネ類やシンビジウム類の花粉を交配すると容易に多量の種子が得られる。しかしこれらの種子を播種してみると、その発芽、苗の性状より見て単為生殖の可能性が極めて大きい。これは花粉のホルモンの刺激によって子房が発達し、卵細胞の倍数性単為生殖によるものかあるいは胎座などの母体の栄養組織から胚が由来する無配生殖によって種子を形成するものと考えられている（伊藤五彦・唐沢耕司、1969. 「エビネとその仲間」、誠文堂新光社、206-207.）。

【0011】

また、ランの一種であるジゴペタラムの柱頭へオーキシンの一種であるナフタレン酢酸を与えることにより、単為生殖を誘導できたと報告されている（森源次郎・山岡浩一・今西英雄、1989. 「数種のランにおける単為生殖による種子について」 園芸学会雑誌、第58巻別冊2、森源次郎・山岡浩一・今西英雄、1991. 「*Zygopetalum mackayi* の単為生殖による種子形成について」、園芸学会雑誌、第60巻別冊2、466-467）。

【0012】

本発明は、ラン類の未受精花へのオーキシン処理により、単為発生に基づく種子形成を行わせ、この種子から半数体植物および純系植物を得ることを目的としている。

【0013】

【課題を解決するための手段】

まず、未受精花での種子形成を実現する為に、オーキシン処理を行う。開花日から開花30日後までの間に処理を行うのが適当である。

【0014】

処理部位として、ずい柱もしくはずい柱を含む部分にオーキシン水溶液をスブ

レー、塗布もしくは滴下する。なお、図1に一般的なランの花の形態図を示す（内田一仁，1982．洋蘭 The Orchid．講談社．99．より）。

【0015】

ラン類の種類や開花状況によっては花が下を向いていることがあり、オーキシン水溶液が重力によって落下してしまうのを防ぐ為に、寒天やでんぷんなどを水溶液に混入し加熱により粘性を高めること、あるいはラノリン懸濁しペースト化することなどにより、処理部位にオーキシンが留まるようにすることも有効である。

【0016】

オーキシン水溶液のオーキシン濃度は0.1～5.0%とする。

【0017】

オーキシンとして、インドール酢酸（IAA）、4-クロロインドール酢酸、フェニル酢酸、2,4ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）、 α -ナフタレン酢酸（NAA）、2,6ジクロロ安息香酸、インドール酪酸（IBA）、4-クロロフェノキシ酢酸、5-クロロインタゾール酢酸エチル、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸を利用可能である。

【0018】

処理直後から花被片のしおれが見られるようになり、1週間程度で子房の肥大が確認される。

【0019】

子房の発育および種子形成はラン類植物の種類によって異なるが、処理後2ヶ月から6ヶ月で種子の熟成が観察される。この間、種子の落下に十分注意する必要がある。また、通常の交配、結実に比べ、1ヶ月から2ヶ月ほど早めに種子が熟することもある。

【0020】

熟した種子を採取し、無菌状態で播種を行う。播種は慣行法に則り行う。種子の発芽率は通常の交配種子に比べ低くなる。

【0021】

発芽が見られ、一定の大きさに生育したら、速やかに半数体植物であるかどうか

かを確認する。半数体植物であることの確認は、発芽個体の組織の一部を取り出し、染色体の数もしくはDNA含量を測定し、これらの値を自家受粉由来植物と比較することにより行う。発芽から一定の期間を経過した後では、半数体植物の染色体数が自然に倍化している可能性がある為、半数体植物の確認は発芽から1～5ヶ月以内に行う必要がある。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態として一実施例を説明する。

【0023】

実施例としてシラン *Bletilla. Brigantes* ‘H5-11’ を用いた。供試株は慣行法で育成されたものである。開花を確認し花粉を取り除き、 α -ナフタレン酢酸を2%含む温めたラノリンペーストをスポイトを用いて10 μ l ずつ柱に滴下処理した。同一個体に複数の花が着生する為、上記の処理を各個体について5反復以上行った。

【0024】

子房が肥大したものは完全に熟してから（処理から6～7ヶ月後）採取し、0.5%次亜塩素酸溶液で5分間表面殺菌をし、無菌容器中に播種し発芽を促した。

【0025】

播種後、播種した種子数および有胚種子数を観察したところ、全播種種子数7,037に対して、有胚種子11個を確認した。

【0026】

表1に播種に使用した培地組成を示す。

【0027】

【表1】

実施例における無菌播種で用いた培地成分表

Hyponex (6.5:6.0:19.0)	3 g/l
ショ糖	20 g/l
寒天	10 g/l

【0028】

播種から2週間後、これらの有胚種子からオーキシン処理由来植物8個体の発芽が確認された。

【0029】

オーキシン処理由来植物がサンプリングに適当な大きさに生育した後（発芽から1～2ヶ月後）、フローサイトメーターを用いてこれらオーキシン処理由来植物のDNA含量を測定し、同時に染色体を観察して染色体数を調査した。

【0030】

調査は実生苗の幼葉を採取して行い、本発明による α -ナフタレン酢酸（NAA）処理したものと、比較のため自家受粉由来の植物について実施した。図2はフローサイトメーターによる分析結果を示し、図3は顕微鏡による染色体の観察結果を示す。図2に示すように、フローサイトメトリー機器を用いたDNA含量調査においては、自家受粉由来植物で見られたピークに対して、オーキシン処理由来植物では約半分の位置にピークが見られた。

【0031】

染色体の観察においては、図3に示すように、オーキシン処理由来植物の染色体が16本であることが観察され、これはシランの染色体数32本の半分であることが確認された。

【0032】

発芽から5～6ヶ月後、オーキシン処理由来植物のDNA含量を再度フローサイトメーターで測定したところ、そのピークは自家受粉由来植物とほぼ同じ位置に確認されたため、発芽2～5ヶ月後の間にオーキシン由来植物の染色体数が自然に倍化していることが確認された。

【0033】

これらの観察結果から、オーキシン処理由来植物が半数体であることが確認された。また、これらのオーキシン処理由来植物はその後の時間経過に従い、染色体数が自然に倍化することが同時に観察され、発芽から2ヶ月以内に染色体数を確認することが必要であることが確認された。

【発明の効果】

すでに述べたように、本発明によるラン類の半数体育成は、ラン類の種子繁殖品種作出に必要な純系植物の提供を可能とするものであり、このことにより、突然変異などの危険性の低い、安定した優良品種の提供が長期にわたり可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

一般的なランの花の形態を示す図である。

【図2】

フローサイトメーターによる分析結果を示す図である。

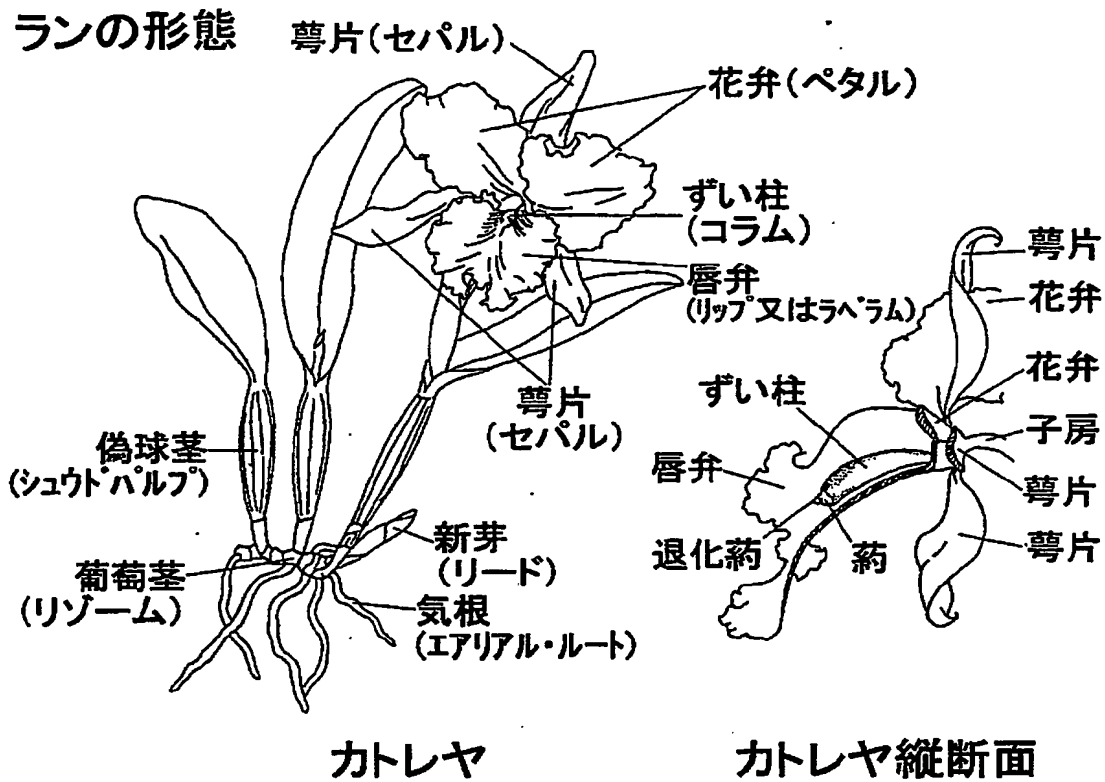
【図3】

顕微鏡による染色体の観察結果を示す図である。

【書類名】

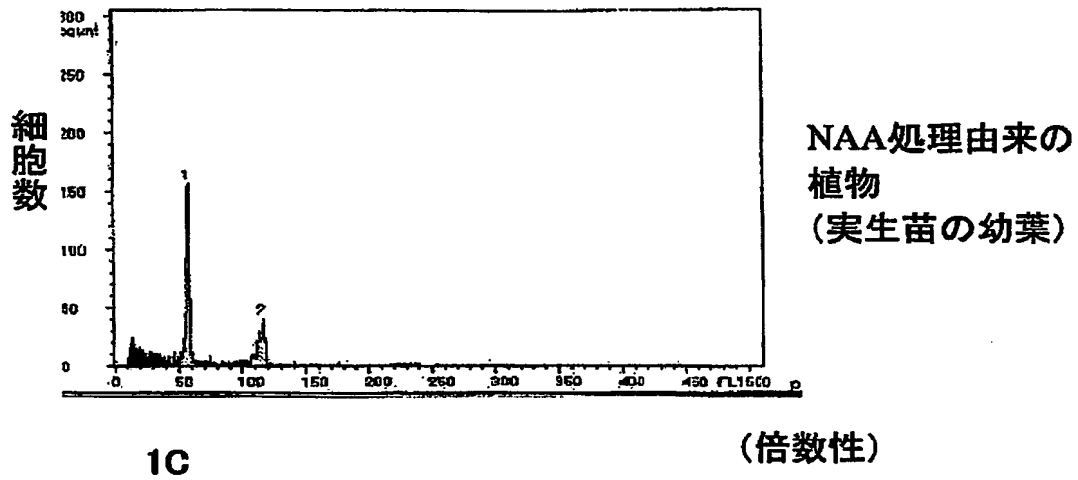
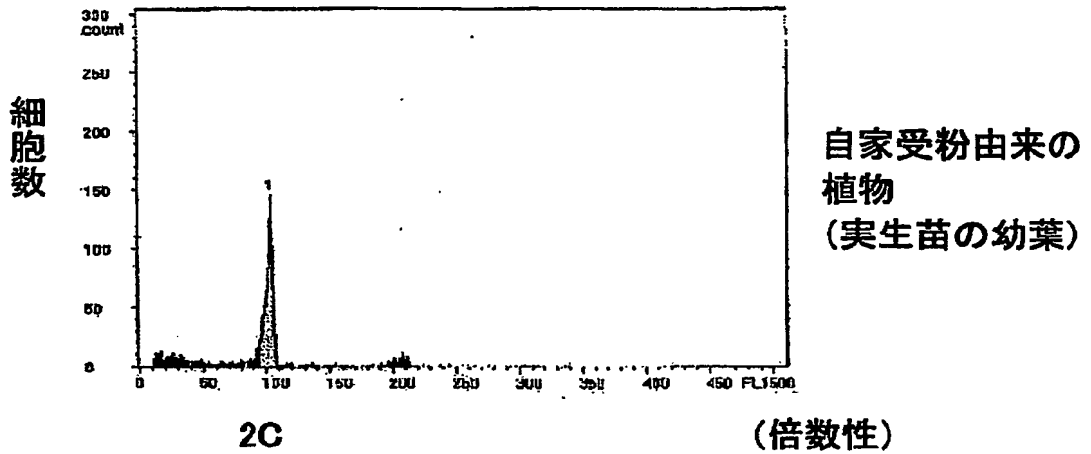
図面

【図 1】



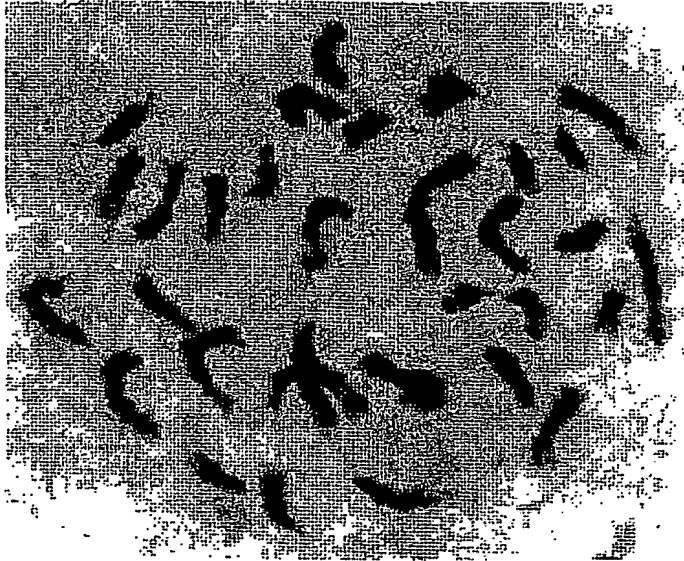
【図 2】

フローサイトメーターによる分析結果

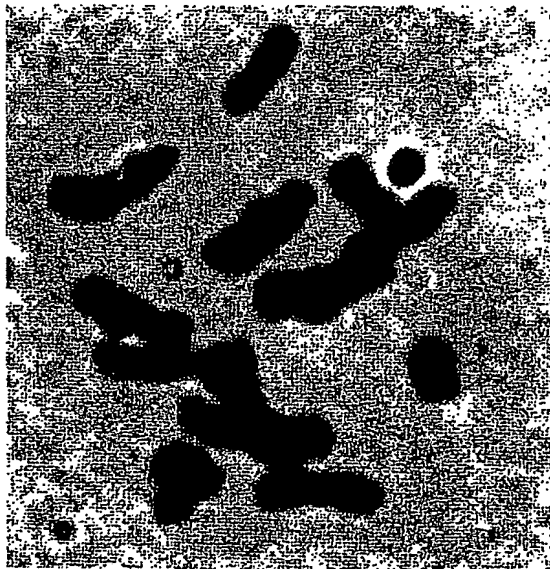


【図3】

染色体観察結果



自家受粉由来植物 $2n=32$ (根端)



NAA処理由来植物 $n=16$ (根端)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ラン類種子繁殖品種作出に必要な純系植物を提供する。

【解決手段】 ラン類未受粉花にオーキシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて育成したラン類植物から半数体植物を判別し、半数体植物と判別された発芽した種子を育成して染色体の倍化した純系植物となしてラン類の種子繁殖品種とする。

【選択図】 図 2

特願 2 0 0 2 - 2 1 3 7 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 1 9 6]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 4 年 1 2 月 2 2 日

住所変更

東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 1 号
サッポロビール株式会社

2. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

2 0 0 3 年 7 月 1 7 日

名称変更

東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 1 号
サッポロホールディングス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.